и 72 часа после заражения, удалось выделить возбудителя из головного мозга. Типичные для гемофилезного полисерозита поражения суставов, наблюдаемые у животных второй группы, были также подтверждены результатами бактериологического исследования.

По мнению ряда авторов [3, 4, 6], тяжесть патоморфологических изменений у свиней, экспериментально зараженных возбудителем гемофилёзного полисерозита, зависит от вирулентности штамма, заражающей дозы и способа заражения.

Выводы

1. У свиней, зараженных штаммом *H. parasuis* «ИЛ-1» в дозе 2х10^9 м.к. развивается септическая форма заболевания, сопровождающаяся синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови с тяжелыми нарушениями в системе гомеостаза, тромбозами и геморрагиями.

2. При септической форме заболевания возбудитель преодолевает гематоэнцефалический барьер, что подтверждают результаты бактериологического исследования головного мозга.

3. При заражении животных дозой 5х10^8 м.к. у них развивается типичная болезнь Глессера с поражением суставов конечностей.

РЕЗЮМЕ

Статья посвящена изучению патолого-анатомических и патолого-гистологических изменений у свиней, экспериментально зараженных различными дозами возбудителя гемофилёзного полисерозита свиней.

SUMMARY

Piglets at the age of 40-55 days were subjected to intraperitoneal infection by different doses of *H. parasuis* «IL-1» strain. The infectious dose of 2x10^9 microbial cells caused death of all animals in 48-72 hours. The animals died from the septic form of the disease accompanied by the disseminated intravascular coagulation. After the inoculation with a dose of 5x10^8 microbial cells two animals out of four died on day 5 and 6; they demonstrated changes typical for Glasser's disease.

Литература

1. Effect on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of Haemophilus parasuis infection / H. Amano, M. Shibata, K. Takahashi [et al.] // J. Vet. Med. Sci. 1997. Vol. 56. P. 451-455.
2. Glăsser, K. Untersuchung ŭber die Schweinseuche mit besonderer Berŭcksichtigung ihrer Ătiologie und Pathologic / K. Glăsser // Dtsch. tierarztl. Wochenschr. 1910. №18. S. 729-733.
3. Hoeflind, D.C. The various forms of Haemophilus parasuis / D.C. Hoeflind // J. Swine Health Production. 1994. Vol. 1, 2. P. 512-514.
4. Kielstein, P. Relationship between serology, virulence and protein patterns of Haemophilus parasuis / P. Kielstein, H. Rosner, H. Muller // Proc. Int. Pig Vet. Soc.-Lausanne,1990. P. 180.
5. Neil, D.H. Glăsser's disease of swine produced intratracheal inoculation of Haemophilus suis / D.H. Neil, K.A. McKay, C. L'Ecuyer // Can. J. Comp. Med. 1969. Vol. 33. P. 187-193.
6. Haemophilus parasuis septicemia in pigs / R.L. Peet, J. Fry, J. Henderson [et al.] // Australian Vet. J., 1983. Vol. 60. P. 187.
7. Rapp-Gabrielson, V.J. Haemophilus parasuis / V.J. Rapp-Gabrielson // Diseases of Swine. 8th-ed. Ames, Iowa, 1992. P. 475-482.
8. Riley, M.G. Haemophilus parasuis infection in swine / M.G.I Riley, E.G. Russel, R.B. Callinan // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1977. Vol. 171. P. 649-651.

УДК 619:616.98:579.843.96:573.6.086.83:57.083.3

Н.Б. Шадрова, О.В. Прунтова, М.А. Коржавина

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К БАКТЕРИЯМ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* В НЕПРЯМОМ ВАРИАНТЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА

Введение

Актинобациллезная плевропневмония свиней – респираторное заболевание, которое характеризуется при остром течении – геморрагическим воспалением легких и фибринозным плевритом, а при подостром и хроническом — развитием очаговой гнойной некротизирующей плевропневмонии и фибринозным плевритом [2]. Диагноз на актинобациллезную плевропневмонию ставят на основании анализа эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных с обязательным учетом результатов бактериологи-

ческого исследования [1]. Принятая в нашей стране схема серодиагностики предусматривает выявление антител с помощью традиционных серологических реакций: реакции агглютинации, реакции непрямой гемагглютинации и реакции связывания комплемента [2]. В то же время ряд работ посвящен использованию иммуноферментного анализа для определения антител в сыворотке крови против бактерий *A. pleuropneumoniae* [4, 5, 6]. Существуют коммерческие тест-системы фирм «IDEXX» (США) и «CIVTEST» (Испания), способные выявлять антитела у инфицированных животных. В качестве антигена в перечисленных тест-системах используют рекомбинантные белки и токсины, что делает их производство дорогостоящим, поэтому целью нашей работы было создание отечественной тест-системы на основе твердофазного ИФА для выявления антител против бактерий *A. pleuropneumoniae*.

Материалы и методы

Бактерии A. pleuropneumoniae. В работе использовали следующие референтные штаммы бактерий, полученные из Американской коллекции типовых культур: A. pleuropneumoniae серовар 1 (штамм № 27088), серовар 2 (штамм № 27089), серовар 5 (штамм № 33377).

Сыворотки. В работе использовали сыворотки крови, полученные от вакцинированных и невакцинированных свиней.

Непрямой вариант ИФА. Выполняли по общепринятой методике. Полистироловые 96-луночные планшеты фирмы «Nunc» (Дания) сенсибилизировали липополисахаридным (ЛПС) антигеном *A. pleuropneumoniae* разных серотипов в 0,1М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5). После 16-18 часов инкубации при 4° С содержимое лунок удаляли и вносили 1% раствор сухого обезжиренного молока для блокирования не связавшихся с антигеном свободных мест в лунках. Планшеты инкубировали 1 час при комнатной температуре. Серийные разведения контрольных (отрицательных и положительных) и испытуемых сывороток наносили по 100 мкл в лунку, начиная с разведения 1:100. Антисвиной иммунопероксидазный коньюгат (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) в разведении 1:500 вносили также по 100 мкл в лунки планшета. После каждого этапа планшеты отмывали 3 раза. Для разведения тестируемых и контрольных образцов, антивидового коньюгата и межэтапной промывки использовали 0,05М трис-HCl буфер с 0,2М NaCl, содержащий 0,1% твин-20 (рН 7,6). Окрашивали субстратной смесью ортофенилендиамина (0,04%) в фосфатно-цитратном буфере (рН 4,9) с добавлением 0,4% H_2O_2. Учитывали реакцию спектрофотометрически при длине волны 492 нм. По измеренным оптическим плотностям образца положительной (K^+) и отрицательной (K^-) контрольных сывороток рассчитывали величину (S/P) для каждого разведения, которая выражалась в виде:

$$S/P = (ОП - K^-)/(K^+ - K^-),$$

где ОП – оптическая плотность исследуемых сывороток.

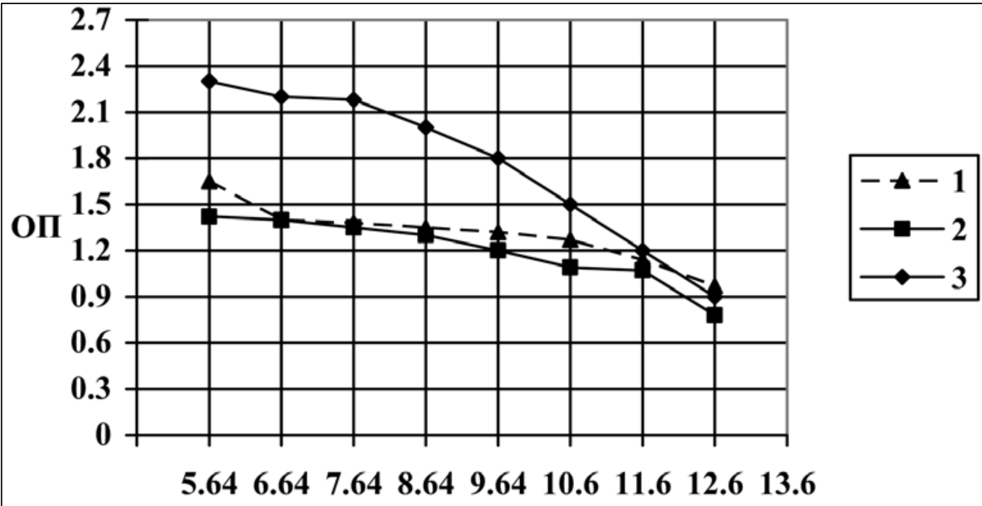
Коммерческие тест-системы. В работе использовали коммерческий набор для определения антител к бактериям A. pleuropneumoniae в сыворотках крови свиней фирмы «CIVTEST» (Испания).

Результаты и обсуждение

В качестве антигена для ИФА используют как цельную бактериальную клетку, так и различные экстракты клетки [7]. На начальном этапе исследований мы сравнивали следующие антигены: прогретый при 100° С экстракт бактериальных клеток, капсульный полисахарид и липополисахарид, полученный путем фенольно-водной экстракции. В ходе исследований получили результаты, свидетельствующие о том, что липополисахарид в большей степени отвечает требованиям, предъявляемым к антигенам для ИФА (по специфичности и активности). Кроме того, была отмечена доступность процедуры получения ЛПС антигена.

Липополисахаридный антиген получали из 18-часовой агаровой культуры *A. pleuropneumoniae* серовар 1 (штамм № 27088), серовар 2 (штамм № 27089), серовар 5 (штамм № 33377) методом фенольно-водной экстракции [6]. Активность антигена проверяли в непрямом варианте ИФА с контрольными сыворотками. В качестве контрольных использовали сыворотки, полученные при иммунизации свиней монопрепаратами *A. pleuropneumoniae* серовар 1 (штамм № 27088), серовар 2 (штамм № 27089), серовар 5 (штамм № 33377). Результаты проверки активности ЛПС антигенов (АГ) отражены в графической форме на рис.. Оптимальной считали такую концентрацию антигена, при которой значение оптической плотности контрольной положительной сыворотки было в диапазоне 0,9-1,2.

Исходя из полученных данных, оптимальная концентрация антигенов при нанесении на планшеты была установлена для ЛПС АГ *A. pleuropneumoniae*



разведение антигена (log_2)

Рис. Активность ЛПС антигенов *A. pleuropneumoniae* в ИФА
1) ЛПС АГ *A. pleuropneumoniae* **серовар 1;**
2) ЛПС АГ *A. pleuropneumoniae* **серовар 2;**
3) ЛПС АГ *A. pleuropneumoniae* **серовар 5**

Таблица 1

Константы линий регрессии для трех разведений сывороток крови свиней

Серотип	Разведение					
	1:100		1:200		1:400	
	Коэффициент корреляции	Стандартная ошибка	Коэффициент корреляции	Стандартная ошибка	Коэффициент корреляции	Стандартная ошибка
1	0,7733	0,051817	0,7739	0,079103	0,8339	0,059927
2	0,7179	0,046075	0,7214	0,058317	0,7658	0,038428
5	0,8080	0,037130	0,7764	0,048507	0,8102	0,039091

Таблица 2

Статистические параметры для расчета ПНП

Статистические параметры	S/P		
	серотип 1	серотип 2	серотип 5
Среднее значение (n=103)	0,101	0,124	0,123
Минимальное значение	0,002	0,001	0,005
Максимальное значение	0,3	0,34	0,32
Стандартное отклонение	0,069320	0,076440	0,082272
Стандартная ошибка	0,008503	0,009708	0,010127

серовар 1 – 1:6400 (log_2 – 12,64), ЛПС АГ *A. pleuropneumoniae* серовар 2 – 1:3200 (log_2 – 11,64), ЛПС АГ ЛПС АГ A. pleuropneumoniae серовар 5 – 1:1600 (log_2 – 10,64).

Специфичность антигенов проверяли в ИФА с сыворотками крови свиней, содержащими антитела к бактериям *Pasteurella multocida, Salmonella choleraesuis, Haemophilus parasuis и Mycoplasma hyopneumoniae*. Выбор сывороток для контрольной панели обусловливался перечнем возбудителей, от которых необходимо дифференцировать актинобациллезную плевропневмонию при постановке диагноза [1]. Активность антигенов с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень, полученный в реакции с отрицательной сывороткой, что свидетельствует о высокой специфичности антигенов.

С целью определения оптимального рабочего разведения сывороток вычислили зависимость титра антител, определенного методом последовательных разведений сывороток, от значений lg(S/P), подсчитанных для 140 сывороток в разведениях 1:100, 1:200, 1:400 (8). Для каждого разведения была построена отдельная линия регрессии. Результаты регрессионного анализа по трем серотипам представлены в табл. 1.

Полученные данные показывают, что все представленные разведения име-

Таблица 3

Пороговые значения S/P

Серотип	Группы сывороток		
	отрицательные	**сомнительные**	**положительные**
1	0–0,240	0,240–0,310	0,31 и выше
2	0–0,280	0,280–0,350	0,35 и выше
5	0–0,290	0,290–0,370	0,37 и выше

Таблица 4

Результаты исследования сывороток свиней с использованием разработанной тест-системы (n=25)

Статус животных	Средние значения S/P		
	серотип 1	**серотип 2**	**серотип 5**
До вакцинации	0,024+0,01	0,28+0,025	0,1+0,05
После 1- й вакц.	0,024+0,01	0,36+0,04	0,27+0,03
После 2- й вакц.	0,43+0,04	1,02+0,1	0,47+0,04

Таблица 5

Результаты исследований сывороток в двух тест-системах

Результаты в наборе CIVTEST	Положительные результаты в Н-ИФА	Отрицательные результаты в Н-ИФА
Положительные 149	140	9
Отрицательные 36	1	35
Всего 185	141	44

ют сильную корреляционную связь, однако оптимальные значения коэффициента корреляции и стандартной ошибки имеет разведение 1:400. Это разведение было принято в качестве рабочего.

Для объективной оценки иммунного ответа установили позитивно-негативный порог (ПНП). Предварительно протестированные в реакции агглютинации и в коммерческом наборе «CIVTEST APP» (Испания) 103 отрицательные сыворотки крови свиней исследовали в непрямом ИФА в разведении 1:400 с антигенами трёх серотипов. ПНП определяли, рассчитывая средние значения S/P отрицательных сывороток, прибавляя три значения стандартного отклонения (для расчета верхней границы ПНП) и два значения стандартного отклонения (для расчета нижней границы ПНП) [8]. Значения S/P, лежащие в диапазоне между нижней и верхней границей ПНП, признавали сомнительными.

В итоге установили пороговые значения S/P для разных групп сывороток, которые приведены в табл. 3.

Одним из этапов нашей работы было тестирование сывороток крови свиней, полученных до и после иммунизации животных, с применением иммуноферментной тест-системы на основе ЛПС антигенов. Животных иммунизировали двукратно с интервалом в 21 день вакциной, содержащей три сероварианта *A. pleuropneumoniae*: серовариант 1, серовариант 2, серовариант 5. Результаты исследований представлены в табл. 4.

Из данных таблицы видно, что сыворотки до вакцинации, по всем трем серотипам, показали себя как отрицательные. После первой вакцинации значение S/P для 5 серотипа достигло уровня сомнительных, а для 2 серотипа – слабоположительных результатов. После второй вакцинации сыворотки, по всем трем серотипам, были оценены как положительные.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что разработанные нами тест-системы пригодны для оценки уровня накопления антител после вакцинации.

Кроме того, мы проанализировали полевые сыворотки (n=185) параллельно в разработанных нами тест-системах (Н-ИФА) и в коммерческом наборе «CIVTEST APP» (Испания), что позволило рассчитать чувствительность и специфичность набора относительно коммерческого теста. Результаты исследований представлены в табл. 5.

Чувствительность метода вычисляли как:

A/Bх100%, где

А – количество положительных проб при тестировании в разработанном варианте ИФА, совпадающее с количеством положительных проб в «CIVTEST APP»;

В – количество положительных проб в «CIVTEST APP».

Специфичность вычисляли как

C/Dх100%, где

С – количество отрицательных резуль-

татов в разработанном варианте ИФА, совпадающее с количеством отрицательных проб в «CIVTEST APP»;

D – количество отрицательных проб в «CIVTEST APP».

Чувствительность разработанного метода относительно коммерческой тест-системы составила 94%, специфичность – 97%.

Таким образом, сравнительный анализ данных, полученных при тестировании сывороток крови свиней в двух реакциях, показал высокую специфичность и чувствительность разработанного метода при анализе полевых сывороток.

Выводы

На основе липополисахаридных антигенов разработан непрямой вариант ИФА для определения антител к бактериям *A. pleuropneumoniae* серотип 1, серотип 2, серотип 5 в сыворотках крови свиней.

РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием липополисахаридных антигенов *A. pleuropneumoniae* серотипов 1, 2 и 5 для выявления антител в сыворотках крови свиней.

SUMMARY

A test-system on the basis of indirect ELISA using lipopolysaccharide antigens of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5 for detection of antibodies in porcine sera was developed.

Литература

1. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции: Справочник / Б.И. Антонов, В.В. Борисова, П.М. Волкова [и др.] М.: Агропромиздат, 1986. С. 240-243.
2. Сидоров, М.А. Гемофилезы животных / М.А. Сидоров, Д.И.Скородумов. М.: Агропромиздат, 1986. С. 50-51.
3. Шадрова, Н.Б. Получение специфических компонентов Actinobacillus pleuropneumoniae для иммуноферментного анализа / Н.Б. Шадрова, О.В. Прунтова, О.И. Ручнова // Ветеринарная патология. (В печати)
4. Detection of antibodies to Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 12 in pig serum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay / L.O. Andresen, J. Klausen, K. Barfod, V. Sorensen // Vet. Microbiol. 2002. V.89. P. 61-67.
5. Chiers, K. Actinobacillus pleuropneumoniae infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles / K. Chiers, E. Donne, I. Overbeke [et al.] // Vet. Microbil. 2002. V.85, №4. P. 343-352.
6. Serodiagnosis of Swine Pleuropneumonia due to Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 7 and 4 Using Long-Chain Lipipolysaccharides / M. Gottschaik, E. Altman, N. Charland [et al.] // Can. J. Vet. Res. 1997. V.61. P. 62-65.
7. Evaluation of saline boiled extract, capsular polysaccharides and long-chain lipopolysaccharides of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1 as antigens for serodiagnosis of swine pleuropneumonia / M. Gottschaik, E. Altman, N. Charland [et al.] // Vet. Microbiol. 1994. V.42. P. 91-104.
8. Rapid serological profiling by enzyme – linked immunjsorbent assay. 2.Comparison of computation methods for measuring antibody titers in a single serum dilution / D.B. Snyder, W.W. Marquardt, E.T. Malison, E. Russec // Avian Dis. 1982. Vol.27. P. 474-484.

УДК 619:616.98:579.843.94:615.371

Ф.А. Ширяев, А.В. Потехин, В.С. Русалеев

РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕМОФИЛЕЗНОГО ПОЛИСЕРОЗИТА СВИНЕЙ

Введение

В настоящее время респираторная патология свиней остается одной из наиболее актуальных и экономически значимых проблем ветеринарии. В этой категории ведущее место занимают болезни бактериальной этиологии, в частности гемофилезный полисерозит свиней (болезнь Глессера). Заболевание широко распространено на территории Российской Федерации [3, 5] и характеризуется серозно-фибринозным воспалением перикарда, плевры, брюшины, а также артритом и негнойным менингоэнцефалитом [7, 9].

Основополагающим в комплексе мероприятий по борьбе с гемофилезным полисерозитом является профилактическая иммунизация животных [7, 8]. В качестве средств иммунопрофилактики за рубежом предложен ряд сорбированных и эмульсионных инактивированных вакцин. Однако имеющиеся биопрепараты из-за высокой стоимости не нашли широкого применения в нашей стране, что вызывает необходимость изыскания новых средств специфической профилактики данного заболевания.

В технологии изготовления противобактериальных вакцин главное место отводится этапу получения микробной мас-